

⑩ 日本国特許庁 (JP)  
⑫ 公開特許公報 (A)

⑪ 特許出願公開  
昭60—9488

⑬ Int. Cl.<sup>4</sup>  
C 12 N 15/00  
// (C 12 N 15/00  
C 12 R 1:02 )

識別記号

庁内整理番号  
7115—4B

⑭ 公開 昭和60年(1985)1月18日

発明の数 1  
審査請求 未請求

(全 5 頁)

⑮ 酢酸菌ベクター

⑯ 特 願 昭58—116149

⑰ 出 願 昭58(1983)6月29日

特許法第30条第1項適用 昭和58年3月10日  
発行社団法人日本農芸化学会の「日本農芸化学会昭和58年度大会講演要旨集」において発表

⑱ 発 明 者 奥村一

半田市山崎町8—3

⑲ 発 明 者 魚住武司

東京都板橋区高島平4—32—8

⑲ 発 明 者 別府輝彦

東京都杉並区堀の内1—5—21

⑳ 出 願 人 別府輝彦

東京都杉並区堀の内1—5—21

㉑ 代 理 人 弁理士 戸田親男

明 細 書

1. 発明の名称

酢酸菌ベクター

2. 特許請求の範囲

2.3.5 Kbの分子量で、第1図に示される制限酵素開裂地図で示されるプラスミドpTA5001(A)及び/又は2.2.5 Kbの分子量で、第2図に示される制限酵素開裂地図で示されるプラスミドpTA5001(B)からなることを特徴とする酢酸菌ベクター。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、酢酸菌ベクターとしてきわめて有用なプラスミドpTA5001(A)及び/又はプラスミドpTA5001(B)に関するものである。

更に詳細には、本発明は、いずれも制限酵素Xho Iによる認識部位をただ1ヶ所有し、かつ酢酸菌への移入が容易なプラスミドpTA5001(A)及び/又はプラスミドpTA5001(B)に関するものである。

従来、酢酸菌由来のプラスミドに関しては、ア

セトベクター・アセチル 1023 が分子量  $17 \times 10^6$  ダルトンのプラスミド pTA5001 (Agric. Biol. Chem. 46(2), 381~389, 1982) を持つこと及びグルコノバクター新細菌 (醸酵工学雑誌, 61(1), 15-18, 1983) の持つプラスミドなどの報告があった。

本発明者らは、このプラスミド pTA5001 を詳細に研究したところ、実際は2ヶのプラスミドの混在物であることを知り、更に2ヶのプラスミドの制限酵素開裂地図の作成を完成させ、その用途を詳細に検討したところ、いずれのプラスミドも制限酵素 Xho I による認識部位をただ1ヶ所有し、かつ酢酸菌への移入の容易なすぐれたベクターであることを確認し、本発明を完成するに至った。

本発明は2.3.5 Kbの分子量で、第1図に示される制限酵素開裂地図で示されるプラスミド pTA5001(A)及び/又は2.2.5 Kbの分子量で、第2図に示される制限酵素開裂地図で示されるプラスミド pTA5001(B)からなることを特徴とする酢酸菌ベクターに関する。

本発明のプラスミド pTA5001(A) とプラスミド pTA5001(B) は同時にアセトバクター・アセチル 1023 に存在し、該菌より両者の混在物として分離することができる。

アセトバクター・アセチル 1023 は酢酸発酵株から単離・同定されたものであり、(Agric. Biol. Chem., 44(12), 2901~2906, 1980) プラスミド pTA5001(A) 及びプラスミド pTA5001(B) を含んだまま微工研に FERM P-7122 として寄託されている。

アセトバクター・アセチル 1023 は菌学的性質においてバージイ第 8 版のアセトバクター・アセチの菌学的性質の記載とよく一致し、更に酢酸耐性及びエタノール酸化能を有することで特徴的であり、*Acetobacter aceti* 161023 (Ace<sup>r</sup>, Bih<sup>++</sup>) と表示されることもある。

アセトバクター・アセチル 1023 は、例えば通常的には下記の YPG 培地で培養され、また形質転換株の検出には YPG 培地に抗生物質等の薬剤を適当な濃度となるように、例えばアンピシリン

を 50  $\mu$ g/ml の濃度となるように、添加したものをを用いて培養される。

( Y P G 培地 )

イースト エキストラクト	0.5 %
ポリペプトン	0.2 %
グルコース	3.0 %
寒天 ( 固体培地の場合 )	2.0 %

pH = 6.5

アセトバクター・アセチル 1023 は YPG 液体培地で、30℃ で 24~36 時間振とう培養し、培養液を遠心分離処理して集菌される。菌体は緩衝液で十分洗浄し、緩衝液に懸濁され、これにリゾチームが添加され、溶菌される。溶菌液には界面活性剤及び食塩が添加され、静置後遠心分離し、上清にポリエチレングリコールが添加され、静置後遠心分離し沈殿物を得る。この沈殿物を緩衝液に溶解し、エチジウムブロマイドを加え、更に塩化セシウムを加え、密度を 1.57 に合わせ、密度勾配遠心分離を行なう。遠心分離後、遠心チューブに紫外線ランプで 365 nm の紫外線照射によ

り、染色体バンドの下に出たバンドを分取する。

ここに得られるバンドにはプラスミド pTA5001(A) とプラスミド pTA5001(B) が混在している。

混在する 2 つのプラスミドは制限酵素による解析の結果、はじめて 2 種類のほぼ同一分子量のプラスミドの混在物であることが明らかとなったものである。

プラスミド pTA5001(A) の分子量は 2.35 Kb で、制限酵素開裂地図は第 1 図に示される。

また、プラスミド pTA5001(B) の分子量は 2.25 Kb で、制限酵素開裂地図は第 2 図に示される。

第 1 図及び第 2 図に示される略記号の意味は次の通りである。

E : EcoRI : *Escherichia coli* RY13

給源の制限酵素

S : SalI : *Streptomyces albus* G

給源の制限酵素

X : XhoI : *Xanthomonas holcicola*

#### 給源の制限酵素

本発明のプラスミド pTA5001(A) 及びプラスミド pTA5001(B) はいずれも XhoI によつてただ 1ヶ所のみ切断されることによつてきわめて特徴的であつて、この切断部位に他のプラスミド断片や染色体断片を導入し、キメラプラスミドを作成するのがきわめて容易である。

本発明のプラスミド pTA5001(A) 及びプラスミド pTA5001(B) はそれぞれ単独もしくは混在物で酢酸菌ベクターとして使用されるものである。

即ち、プラスミド pTA5001(A) 及び/又はプラスミド pTA5001(B) にプラスミド断片又は染色体断片を導入したキメラプラスミドは、酢酸菌 (アセトバクター属菌、グルコノバクター属菌) に容易に移入することができ、酢酸菌の形質転換及び/又は物質生産に新たな画期的手法を提供するものである。

次に本発明の実施例を示す。

#### 実施例 1、DNA 受容菌体の調製

アセトバクター・アセチル 1023, FERM P-

7122より100 $\mu$ g/ml濃度のニトロソグアニジン(NTG)変異処理によつて得られたプロリン要求性( $Pro^-$ )の親株であるアセトバクター・アセチ10-8( $Ace^+$ ,  $Bth^{++}$ ,  $Pro^-$ )から自然変異によつて得た酢酸耐性およびエタノール酸化能が低下、欠失( $Ace^{ss}$ ,  $Bth^-$ )し、かつ、ストレプトマイシン耐性( $Str^r$ )の菌株であるアセトバクター・アセチ10-8091( $Ace^{ss}$ ,  $Bth^-$ ,  $Pro^-$ ,  $Str^r$ )を500ml坂口フラスコに入れた100ml YPG液体培地に接種し、30℃で20時間振とう培養した。

培養液は0℃で、6,000 $\times$ gで、10分間遠心分離し、集菌する。菌体は100mM NaCl及び5mM  $MgCl_2$ を含有する5mM トリス塩酸緩衝液(pH7.6)の0.5倍容量で2回洗滌する。再び0℃で6,000 $\times$ gで、5分間遠心分離し、集菌する。

この菌体には0.4倍容量の $CaCl_2$ 溶液(100mM  $CaCl_2$ 、250mM KCl、5mM  $MgCl_2$ 、5mM Tris-HCl pH7.6)が加えられ、0℃で30分間静置した後0℃で、6,000 $\times$ gで、5分間遠心分離し、集菌す

る。0℃で20分間静置後、5mlの5M食塩水を加え、0℃で一夜静置した。48,200 $\times$ gで60分間遠心分離をかけ、上清を分取した。次にこの上清に最終濃度で10%になるようにポリエチレングリコール6,000を加え、4℃で一夜静置した後、3,000 $\times$ gで10分間遠心分離し、沈殿物を得た。この沈殿物を7mlのUB緩衝液(50mM トリス塩酸、5mM EDTA、50mM NaCl、pH7.8)に溶解させた後、最終濃度で500 $\mu$ g/mlになるようにエチジウムブロマイドを加え、さらに塩化セシウムを加えて密度を1.57に合わせた。この溶液を15℃、100,200 $\times$ gで40時間密度勾配遠心分離をおこなった。遠心分離後、遠心チューブに紫外線ランプで365nmの紫外線を照射することにより、染色体バンドの下にあらわれるバンドをプラスミド分画として分取した。次いで、分画液をイソプロパノールで処理し、エチジウムブロマイドを除去した後、TB緩衝液(10mM トリス塩酸、1mM EDTA、pH7.5)に対して透析した。これをプラスミド混在溶液とした。

る。

菌体には0.004倍容量の上記 $CaCl_2$ 溶液を添加しDNA受容菌体懸濁液とした。

実施例2、プラスミドpTA5001(A)とプラスミドpTA5001(B)の混在物の単離

アセトバクター・アセチ1023, FERM P-7122を40mlのYPG培地に植菌し、30℃で一晩振とう培養した。

その後新しいYPG培地4ℓに1%で植え継ぎさらに30℃で36時間振とう培養した。

集菌後、TB緩衝液(20mM EDTA、50mM トリス塩酸、pH8.0)で2回菌体を洗浄した。

得られた湿菌体2gあたり7mlのTB緩衝液(50mM トリス塩酸、20mM EDTA、25% ショ糖、pH8.0)を加え、菌体を懸濁し、4mlのリゾチーム液(0.25M トリス塩酸、リゾチーム2%, pH8.0)をさらに加え、0℃で5分静置した。次に0.25M EDTA液(pH8.0)を4ml加え、0℃で5分静置した後、37℃で20分間反応させた。反応後、3mlの10%ラウリル硫酸ナトリウムを加え、37

得られたプラスミド混在溶液中には2つの環状プラスミドが混在しており、制限酵素による解析の結果、第1図に示すプラスミドpTA5001(A)と第2図に示すプラスミドpTA5001(B)であることが明らかとなった。

すなわち前記で調製したプラスミド混在溶液に対し、少なくとも5倍量過剰の制限酵素(EcoRIおよびSalIは宝酒造社製、XhoIは、ベセスダリサーチ社製を使用した。)を常法に従がつて各々の制限酵素の至適条件下で反応させた。反応後、垂直型アガロースゲル電気泳動で分析した。即ち、1%アガロースゲルを用い、トリス酢酸緩衝液(40mM トリス、20mM 酢酸、2mM EDTA、pH8.1)中で泳動させた。その後、ゲルをエチジウムブロマイドの1 $\mu$ g/ml液に浸して染色した。このゲルに紫外線を照射し、生成断片の数を判定し、各断片の泳動距離から、各々の分子量を算出した。分子量は、同一アガロース上で同時に泳動したラムダファージDNAのHind<sup>Ⅲ</sup>切断で生成する分子量既知の各断片の泳動距離から作成した標準線をも

とに算出した。

各種制限酵素を単独で用いて得られた各断片及び各制限酵素の2種以上を組合わせて用いた処理によつて得られた各断片の断片数及び分子量などからpTA5001(A)及びpTA5001(B)の第1図及び第2図に示した制限酵素開裂地図が決定された。

実施例3、プラスミドpTA5001(A)とプラスミドpTA5001(B)の混在物のベクターとしての利用

実施例2で得られたプラスミド混在溶液(DNA量10 $\mu$ g)中に、大腸菌薬剤耐性ベクターであるpACYC177(カナマイシン耐性及びアンピシリン耐性; *Journal of Bacteriology*, 134(3), 1141-1156, 1978)を持つ大腸菌(*Escherichia coli* C600)から得たプラスミドpACYC177(第3図に示す、DNA量2 $\mu$ g)を添加し、少なくとも5倍量過剰の制限酵素Xho Iを常法により至適条件下で反応させ、反応終了後、等量のフェノールを加え激しく攪拌して制限酵素を失活さ

せた後、さらにエーテル抽出を充分行なつてフェノールを除去し、さらに2倍量のエタノールを加えて-80℃に1時間保持した後、15,000 $\times g$ で5分間遠心分離を行なつてDNAを決降させ、さらに真空乾燥してエタノールを除去した後、次に沈澱を水中に溶解後、常法によつてT4 DNA リガーゼによる反応を21℃で2時間行ない、さらに前記と同様にしてエタノール沈澱、真空乾燥を行なつて得られた沈澱をTE緩衝液0.1 mlに溶解してキメラプラスミド含有溶液を得た。

それぞれのキメラプラスミドはいずれもプラスミドpACYC177を含有している。しかし、プラスミドpACYC177のカナマイシン耐性部位にXho I切断点があつて、そこが切断されているためにカナマイシン耐性は発現せず、アンピシリン耐性のみが発現することになる。

次に実施例1で得られたDNA受容菌体懸濁液0.2 mlを用意し、これに上記それぞれのキメラプラスミド含有溶液を加え、0℃で90分間ゆるやかに攪拌しつつ、キメラプラスミドの直接導入を

行なつた。

ここに得られたキメラプラスミド導入菌体を含む液を3 mlのYPG培地に移し、30℃6時間振とう培養を行なつた後、

アンピシリン50 r/ml添加したYPG培地(固体)上で30℃で5日間培養し、9株のコロニーを得た。これらを10-8081-A1~-A9と命名した。このうち、10-8081-A1をアンピシリンを30 r/ml添加したYPG液体培地で30℃、24時間振とう培養し、実施例2の方法に従つてプラスミドを分離して解析したところ、プラスミドpTA5001(A)とプラスミドpTA5001(B)の混在物以外にこれらよりやや分子量の大きいプラスミドが得られた。このプラスミドは先に導入したキメラプラスミドのうち、pTA5001(A)とpACYC177がXho I切断部位を介して連結したキメラプラスミドと認められた。また、アセトバクター・アセチ10-8081はアンピシリン耐性を有しないが10-8081-A1はアンピシリン耐性を持つていることなどからもキメラプラス

ミドが導入され、形質転換が行なわれたことが確認された。

同様にして、少なくとも10-8081-A2~-A6はpTA5001(B)とpACYC177が制限酵素Xho I切断部位を介して連結したキメラプラスミドが導入されていることが確認された。

また、10-8081-A1~-A6の持つキメラプラスミドを再度10-8081に前記と同様の方法で導入したところ、10-8081-A1~-A6の各キメラプラスミドにおいて、1 $\mu$ g DNA量当りに換算して10<sup>5</sup>個前後のアンピシリン耐性の形質転換株が得られた。

#### 4. 図面の簡単な説明

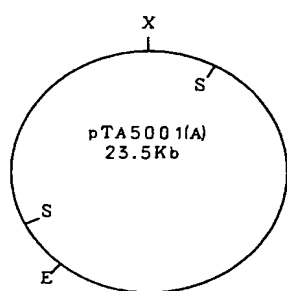
第1図はプラスミドpTA5001(A)の制限酵素開裂地図を示し、第2図はプラスミドpTA5001(B)の制限酵素開裂地図を示し、第3図はプラスミドpACYC177の制限酵素開裂地図を示す。

E... EcoRIによる切断部位、S... Sal Iによる切断部位、X... Xho Iによる切断部位、Km... カナマイシン耐性遺伝子、Am... アンピシリン耐性

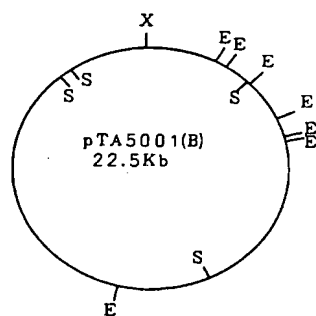
遺伝子

代理人 弁理士 戸 田 親 男

第 1 図



第 2 図



第 3 図

